

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTE  
Bureau international

UELLE



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> C08K 5/17, C08B 37/08, 37/06, 37/10, C08L 5/08, 33/06, A61K 9/20 // (C08L 5/08, 33/06) (C08L 33/06, 5:08)	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> WO 98/08897 <b>(43) Date de publication internationale:</b> 5 mars 1998 (05.03.98)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR97/01534 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 29 août 1997 (29.08.97) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 96/10601 30 août 1996 (30.08.96) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES (S.C.R.A.S.) [FR/FR]; 51/53, rue du Docteur Blanche, F-75016 Paris (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> EL MATNI, Nada [FR/FR]; 46, rue Hamelin, F-75116 Paris (FR). LABARRE, Denis [FR/FR]; 44, rue des 4 Cantons, F-91140 Villebon sur Yvette (FR). FESSIM, Hatem [FR/FR]; 40, rue d'Aubigny, F-69009 Lyon (FR). <b>(74) Mandataire:</b> BOURGOUIN, André; Société de Conseils Ad- ministratifs et Financiers (S.C.A.F.), Service Brevets et Mar- ques, 42, rue du Docteur Blanche, F-75016 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> Avec rapport de recherche internationale.
<b>(54) Title:</b> POLYCARBOXYLIC BASED CROSS-LINKED COPOLYMERS <b>(54) Titre:</b> COPOLYMERES RETICULES A BASE DE POLYMERES POLYCARBOXYLIQUES <b>(57) Abstract</b> The invention concerns cross-linked copolymers with a base of non cross-linked polycarboxylic polymers, said copolymers containing at least one polycarboxylic polysaccharide. The invention also concerns a method for preparing these copolymers and their use in particular as support in pharmaceutical compositions. <b>(57) Abrégé</b> L'invention concerne des copolymères réticulés à base de polymères polycarboxyliques non réticulés, lesdits copolymères contenant au moins un polysaccharide polycarboxylique. L'invention concerne également un procédé de préparation de ces copolymères et leur utilisation notamment comme support dans les compositions pharmaceutiques.		

# UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Biélorus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NI	Niège	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## COPOLYMERES RETICULES A BASE DE POLYMERES POLYCARBOXYLIQUES

L'invention concerne des copolymères réticulés à base de polymères polycarboxyliques non réticulés, les dits copolymères contenant au moins un polysaccharide polycarboxylique. L'invention concerne également un procédé de préparation de ces copolymères et leur utilisation notamment comme support dans les compositions pharmaceutiques.

Certains composés à structure polymérique contenant un polysaccharide polycarboxylique, éventuellement modifié, ont été décrits dans la littérature. Par exemple, la demande WO89/02445 décrit un gel à base d'acide hyaluronique : mais ce gel ne comprend, dans sa structure, que de l'acide hyaluronique et aucun autre polymère polycarboxylique. Par ailleurs, aucun agent de réticulation est utilisé par la préparation de ce gel. Le composé ainsi obtenu est principalement utilisé en chirurgie. La demande WO91/16881 décrit, entre autre, la combinaison d'un principe actif avec une matrice constitué d'un polymère modifié, c'est à dire sur lequel sont greffés des saccharides. Ce polymère modifié peut être un polymère naturel tel que la chondroïtine sulfate. Mais cette matrice ne contient qu'un seul type de polymère.

Les copolymères selon l'invention à base de polymères polycarboxyliques, contiennent au moins un polysaccharide polycarboxylique et au moins un autre polymère polycarboxylique qui n'est pas un polysaccharide. L'association d'un polysaccharide avec un autre type de polymère polycarboxylique, permet de moduler les propriétés des polysaccharides telles que l'hydrophilie. On peut ainsi obtenir des copolymères avec des propriétés de dégradation appropriées en fonction de leurs applications. Par ailleurs, les copolymères selon l'invention, sont avantageusement préparés en milieu aqueux. Ceci est

un réel avantage car il est presque impossible d'éliminer totalement les solvants dans une structure polymérique : l'existence de traces de solvants aqueux résiduels est en général plus facilement acceptable et acceptée que des traces de solvants organiques résiduels tels que le diméthylsulfoxyde ou la diméthylformamide.

- 5 L'invention a pour objet des copolymères réticulés à base de polymères polycarboxyliques non réticulés et d'un agent de réticulation comprenant au moins deux fonctions amine, les dits copolymères comprenant au moins un polysaccharide polycarboxylique et au moins un autre polymère polycarboxylique non réticulé qui n'est pas un polysaccharide polycarboxylique.
- 10 Les polysaccharides polycarboxyliques non réticulés peuvent être choisis, par exemple, parmi les glycosaminoglycanes, l'acide pectinique, l'acide alginique, les dérivés carboxyliques du dextrane tels que les carboxyméthyl-dextranes, ou les dérivés carboxyliques de la cellulose tels que les carboxyméthylcelluloses. Parmi les glycosaminoglycanes, on peut citer l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate,
- 15 l'héparine, le sulfate de dermatane, le sulfate d'héparane, le sulfate de kératane ou un mélange de ces derniers. Parmi les polymères polycarboxyliques qui ne sont pas des polysaccharides, on peut citer le poly(acide glutamique), le poly(acide aspartique), le poly(acide maléique), le poly(acide malique) ou le poly(acide fumarique), les polymères acryliques polycarboxyliques tels que le poly(acide acrylique), le poly(acide
- 20 méthacrylique) ou les copolymères de ces derniers tels que les Eudragits® L et S. L'expression polymères polycarboxyliques comprend les polymères tels que définis ci-dessus mais également les dérivés partiellement ou totalement substitués de ces polymères comme, par exemple, leurs esters, leurs amides ou leurs sels, les copolymères contenant les unités présentes dans ces polymères polycarboxyliques ou dans leurs dérivés tels que
- 25 définies ci-dessus, mais aussi le mélange de ces polymères et/ou de leurs dérivés et/ou de leurs copolymères tels que définis ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet des copolymères réticulés tels que définis ci-dessus, caractérisés en ce que le polysaccharide est choisi parmi l'acide pectinique ou

alginique, les glycosaminoglycanes, et de préférence l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate, l'héparine, le sulfate de dermatane, le sulfate d'héparane, le sulfate de kératane ou un mélange de ces derniers.

L'invention a plus particulièrement pour objet des copolymères réticulés tels que définis  
5 ci-dessus, caractérisés en ce que le polymère polycarboxylique non réticulé qui n'est pas un polysaccharide polycarboxylique est choisi parmi les polymères acryliques polycarboxyliques, le poly(acide glutamique), le poly(acide aspartique), le poly(acide maléique), le poly(acide malique) ou le poly(acide fumarique). De préférence, le polymère polycarboxylique non réticulé qui n'est pas un polysaccharide  
10 polycarboxylique, est un polymère acrylique polycarboxylique et plus particulièrement le poly(acide acrylique) ou le poly(acide méthacrylique).

Les polymères polycarboxyliques selon l'invention, sont liés entre eux par un agent de réticulation. Cet agent de réticulation comprend au moins deux fonctions amines qui sont susceptibles de réagir avec les fonctions carboxyliques libres des dits polymères  
15 carboxyliques non réticulés. Il peut être choisi, par exemple, parmi les protéines, les polyamines, les triamines, les diamines, les acides aminés naturels ou synthétiques, ou les dérivés des composés tels que définis ci-dessus comme, par exemple, leurs sels, leurs esters ou leurs amides. Parmi les acides aminés, on peut citer, par exemple, l'arginine, la lysine, l'histidine et l'ornithine. Parmi les diamines, on peut citer l'éthylènediamine, la  
20 butanediamine, l'hexanediamine, l'heptanediamine, l'octanediamine ou la dodécanediamine. Parmi les polyamines, on peut citer le chitosane, les poly(acide aminé) tels que la polylysine ou la polyornithine, ainsi que les copolymères de ces polyamines. L'agent de réticulation peut également être choisi parmi les composés tels que la spermine, la spermidine, la mélamine, la guanidine ou la diéthylènetriamine. De  
25 préférence, l'agent de réticulation utilisé est un acide aminé et avantageusement la lysine, l'ornithine ou l'histidine.

L'invention a plus particulièrement pour objet également des copolymères réticulés tels que définis ci-dessus, caractérisés en ce que le polysaccharide polycarboxylique est un

polysaccharide polycarboxylique dégradable par la flore microbienne du colon tel que la chondroïtine sulfate, l'acide hyaluronique, l'acide pectinique ou l'héparine.

L'invention a plus particulièrement pour objet des copolymères réticulés tels que définis ci-dessus, caractérisés en ce que le polysaccharide polycarboxylique est la chondroïtine sulfate et l'autre dit polymère polycarboxylique est choisi parmi le poly(acide acrylique) et le poly(acide méthacrylique), et l'agent de réticulation est la lysine ou l'histidine.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation de copolymères réticulés tels que définis ci-dessus, ledit procédé caractérisé en ce que l'on fait réagir les dits polymères polycarboxyliques non réticulés constituant le copolymère réticulé, en présence d'un activateur et d'un agent de réticulation comprenant au moins deux fonctions amine, dans un milieu réactionnel approprié. De préférence, la préparation de copolymères réticulés tels que définis ci-dessus s'effectue en milieu aqueux. L'expression milieu aqueux signifie un milieu ne contenant que de l'eau ou de l'eau mélangée avec un ou plusieurs solvants miscibles à l'eau tel que, par exemple, l'acétone ou les alcools inférieurs tels que l'éthanol. De préférence le milieu aqueux ne comprend que de l'eau. La mise en œuvre du procédé selon l'invention peut s'effectuer de différentes manières. En effet, le procédé peut consister à mélanger ensemble les polymères polycarboxyliques non réticulés et l'agent de réticulation, puis à rajouter l'activateur. Le procédé de réticulation selon l'invention peut consister également à mélanger ensemble les polymères polycarboxyliques non réticulés et l'activateur, puis à rajouter l'agent de réticulation. Le procédé peut consister également à réticuler un des polymères polycarboxyliques non réticulés constituant du copolymère, en mélangeant ce dit polymère avec l'agent de réticulation puis l'activateur ou bien avec l'activateur puis l'agent de réticulation, puis à rajouter dans le milieu réactionnel au moins un autre polymère polycarboxylique non réticulé, pour le réticuler avec le dit polymère présent dans le mélange réactionnel. Lors de la mise en œuvre du procédé, les réactifs mis en présence peuvent être préalablement solubilisés dans le milieu réactionnel choisi. De préférence, les polymères polycarboxyliques non réticulés et l'agent de réticulation sont

mélangés ensemble dans un milieu aqueux jusqu'à solubilisation puis l'activateur est rajouté. Le procédé est mis en œuvre à une température comprise entre -30 et 100°C, de préférence entre 0 et 40 °C et de manière très préférentielle à température ambiante. La température de mise en œuvre du procédé de réticulation est bien évidemment inférieure  
5 aux températures de dégradation ou de décomposition des réactifs mis en présence.

Les proportions relatives des réactifs que sont les polymères polycarboxyliques non réticulés, l'agent de réticulation et l'activateur, peuvent varier selon les caractéristiques des copolymères recherchés. Les proportions des polymères polycarboxyliques non réticulés sont définies par rapport aux quantités molaires des fonctions carboxyliques  
10 présentes par unité de base. Les polymères polycarboxyliques non réticulés peuvent varier dans un rapport molaire compris entre 0.01 et 100. Le rapport molaire de l'agent de réticulation par rapport aux fonctions carboxyliques totales peut varier entre 0.01 et 100. Le rapport molaire de l'activateur par rapport aux fonctions carboxyliques totales peut varier entre 0,01 et 100.

15 L'activateur peut être choisi parmi les agents de couplage classiquement utilisés en synthèse peptidique. Ainsi l'activateur peut être choisi, par exemple, parmi les carbodiimides, des dérivés des quinolines ou des anhydrides mixtes. Comme exemple de carbodiimides, on peut citer les hydrohalogénures tels que l'hydrochlorure de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthyl carbodiimide (EDC), le N-cyclohexyl-  
20 N'-(2-morpholinoéthyl) carbodiimide (CMC). Comme exemple des dérivés des quinolines, on peut citer la 2-éthoxy-N-éthoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline (EEDQ), la N-isobutoxycarbonyl-2-isobutoxy-1,2-dihydroquinoline (IIDQ), la N-isobutoxycarbonyl-2-méthoxy-1,2-dihydroquinoline (IMDQ), la N-isobutoxycarbonyl-2-éthoxy-1,2-dihydroquinoline (IEDQ). Comme exemple d'anhydrides mixtes, on peut  
25 citer les chloroformates et plus particulièrement l'isobutylchloroformate (IBC). De préférence, l'activateur utilisé est l'hydrochlorure de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthyl carbodiimide.

Les copolymères réticulés selon l'invention peuvent être utilisés, par exemple, dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques, biomédicaux, vétérinaires, chimiques, agrochimiques ou agroalimentaires.

Plus particulièrement, l'invention a pour objet une composition pharmaceutique contenant  
5 au moins un principe actif et, à titre de support inerte ou d'excipient, au moins un copolymère réticulé selon l'invention. L'expression principe actif désigne toute substance ou mélange de substances ayant une activité thérapeutique.

Une telle composition peut être élaborée à partir de ces différents composants par toute technique classique connue de l'homme de l'art. Elle peut se présenter, par exemple, sous  
10 forme de comprimés matriciels, de comprimés enrobés par les copolymères de la présente invention, de comprimés multicouches, de pellets matriciels, de pellets ou des microparticules enrobés par les copolymères de la présente invention. Ces microparticules et pellets peuvent être contenus ou non dans des capsules. Elle peut se présenter également sous forme de microparticules ou de nanoparticules dont l'un au moins des  
15 constituants est un copolymère de la présente invention ou bien sous toute autre forme permettant une administration orale. Elle peut se présenter également sous toute autre forme adaptée au mode d'administration choisi ou approprié telle que des suppositoires ou des préparations pour application locale ou pour injection. La quantité du principe actif permettant une action pharmacologique efficace, en particulier thérapeutique, peut varier  
20 en fonction de la nature du principe actif, de l'âge et/ou de la maladie du patient à traiter.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une composition pharmaceutique selon l'invention pour une libération contrôlée du ou des principes actifs qu'elle contient.

De telles compositions peuvent également posséder d'autres caractéristiques qui  
25 dépendent éventuellement des caractéristiques des polymères polycarboxyliques de départ telles que la bioadhésion. Ainsi, une composition pharmaceutique selon l'invention peut également être utilisée en tant que système pharmaceutique bioadhésif. La présente



invention a donc également pour objet l'utilisation d'une composition pharmaceutique selon l'invention en tant que système bioadhésif.

Des compositions telles définies ci-dessus dans lesquelles le polysaccharide polycarboxylique est dégradé par la flore du colon, peuvent également être utilisée en tant que système à libération spécifique au niveau du colon par action de la flore microbienne. Le concept de la libération spécifique au niveau du colon par action de la flore microbienne, est basé sur la propriété du colon de posséder une flore microbienne très abondante qui, de plus, a la potentialité de métaboliser des substances faiblement ou non dégradées par la partie haute du tube digestif. De telles compositions sont particulièrement adaptées pour véhiculer des principes actifs destinés au traitement des maladies du colon, ce qui permet d'augmenter leur efficacité et de diminuer leurs effets secondaires. Parmi ces principes actifs figurent les stéroïdes telles que la dexaméthasone et l'hydrocortisone, les anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que l'acide 5-aminosalicylique, les antinéoplasiques tels que le méthotrexate, le tamoxifène, les antispasmodiques et les agents chimiothérapeutiques. De telles compositions sont particulièrement adaptées également pour véhiculer des principes actifs qui sont absorbés de façon plus efficace au niveau du colon tels que les stéroïdes ou la xanthine. Leur administration directe au niveau du colon permet d'augmenter leur efficacité. De telles compositions sont particulièrement adaptées également pour véhiculer des principes actifs qui sont dégradés dans les parties hautes du tube digestif. Parmi ces principes actifs, on peut citer les peptides et les protéines tels que les vaccins oraux, l'insuline, les peptides contraceptifs, les peptides activateurs du plasminogène, les peptides de croissance, LH/RH.

Les exemples suivants sont présentés pour illustrer les procédures ci-dessus et ne doivent en aucun cas être considérés comme une limite à la portée de l'invention.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

EXEMPLE 1

1,33 g de sel sodique de chondroïtine sulfate (A à 70%, C à 30 %) (CS), 0,29 g de sel sodique d'acide polyméthacrylique (PMA) et 3,35 g de monochlorhydrate de L-lysine sont mélangés ensemble dans 9 ml d'eau bidistillée jusqu'à obtention d'une solution limpide qui est par la suite dégazée. Puis on ajoute 4,59 g de chlorhydrate de N-éthyl-N'-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC). Le pH est maintenu entre 6 et 7 par ajout successif d'acide chlorhydrique 2,5 N. La réaction est effectuée à température ambiante pendant 6 heures. Puis le milieu réactionnel est transvasé dans un boudin de dialyse (Spectra/por, de seuil de coupure 12-14 KD) et dialysé 4 fois contre 4 litres d'eau à chaque fois. Le précipité ainsi obtenu est lavé à l'eau puis séché. On obtient le copolymère de chondroïtine sulfate et d'acide polyméthacrylique recherché de masse moyenné  $1,53 \pm 0,12$  g. L'utilisation du soufre comme marqueur de la chondroïtine sulfate permet de définir, par une analyse élémentaire, le pourcentage en masse de chondroïtine sulfate dans le copolymère qui est égal à  $59 \pm 2$  %.

EXEMPLE 2

On travaille de la même manière que dans l'exemple 1, mais en utilisant 1,77 g de monochlorhydrate de L-lysine et 2,76 g d'EDC. La masse du copolymère obtenu est de  $1,06 \pm 0,15$  g ; le pourcentage en masse de CS dans le précipité est de  $55 \pm 2$ .

20 EXEMPLE 3

On travaille de la même manière que dans l'exemple 1, mais en utilisant 7,06 g de monochlorhydrate de L-lysine et 8,21 g d'EDC. La masse du copolymère obtenu est de  $1,61 \pm 0,12$  g ; le pourcentage en masse de CS dans le précipité est de  $61 \pm 1$ .

EXEMPLE 4

On travaille de la même manière que dans l'exemple 1, mais en utilisant 3 g d'histidine à la place de la L-Lysine. La masse du copolymère obtenu est de  $1,94 \pm 0,01$  g ; le pourcentage en masse de CS dans le précipité est de  $48 \pm 3$ .

5 EXEMPLE 5

On travaille de la même manière que dans l'exemple 1, mais en utilisant 0,43 g de PMA, 4,5 g de monochlorhydrate de L-lysine et 5,82 g d'EDC. La masse du copolymère obtenu est de  $1,86 \pm 0,05$  g ; le pourcentage en masse de CS dans le précipité est de  $58 \pm 2$ .

10 EXEMPLE 6

On travaille de la même manière que dans l'exemple 1, mais en utilisant 0,58 g de PMA, 5,45 g de monochlorhydrate de L-lysine et 7,05 g d'EDC. La masse du copolymère obtenu est de  $2,07 \pm 0,01$  g ; le pourcentage en masse de CS dans le précipité est de  $54 \pm 2$ .

15 EXEMPLE 7

Des essais de solubilisation du copolymère de l'exemple 1 sont effectués dans les solvants et mélanges de solvants suivants : eau à pH 3 et 7, acétonitrile, éthanol, tétrahydrofurane, dichlorométhane, diméthylsulfoxyde, diméthylacétamide, acétone, dioxane, triéthylamine, chloroforme, éther de pétrole, hexane, diméthylformamide, alcool  
20 benzylique, heptane, alcool isopropylique, propanediol-1,2, mélange eau / acétone (50%/50%), mélange eau /éthanol (50%/50%).

Le copolymère est insoluble dans tous ces solvants ce qui montre son caractère réticulé.

### Etude de la dégradation enzymatique de copolymères

#### 1- étude spectroscopique

Nous étudions ici la dégradation des copolymères de l'invention à base de chondroïtine sulfate, par les chondroïtinases, enzymes de la flore microbienne du colon.

- 5 Des suspensions de copolymères des exemples 1 à 6, dans un tampon (acétate/tris/albumine) de pH 7,3, sont préparées et agitées pour se stabiliser quelques heures. Les suspensions contiennent 67 mg de CS/ml de tampon. Une solution de chondroïtinases est rajoutée à raison de  $3.10^{-3}$  UE (Unité Enzymatique) pour chaque mg de CS contenue dans la suspension. Le mélange est incubé à 37°C. A des temps
- 10 déterminés, une suspension est centrifugée à 4°C puis filtrée. Ensuite, une étude de l'absorbance UV du surnageant est effectuée. Les disaccharides provenant de la dégradation de la CS ont un maximum d'absorption à 230-240 nm (Yamagata, T. et al., *J. Biol. Chem.*, 243(7):1523-1535(1968) ; Salyers, A. et coll., *J. Bactériol.*, 143(2):772-780)). Le témoin est une solution de CS non réticulée préparée dans les
- 15 mêmes conditions opératoires que ci-dessus.

Les cinétiques d'apparition en solution des disaccharides provenant de la dégradation de la CS non réticulée et du copolymère obtenu dans l'exemple 1 sont présentées dans la figure 1 ci-après.

- Ces résultats montrent que le copolymère de l'exemple 1 est dégradé par les enzymes. La
- 20 comparaison de la dégradation du copolymère de l'exemple 1 avec celle du témoin, montre que le copolymère, bien que réticulé, est rapidement dégradé par les enzymes.

On procède de la même façon sur les copolymères des exemples 2 à 6 : les résultats montrent que ces copolymères contenant la CS sont dégradés par les chondroïtinases.

## 2- étude rhéologique

La dégradation enzymatique des copolymères entraîne l'apparition de chaînes moléculaires de plus petites tailles et devrait entraîner par conséquent la diminution de la viscosité du milieu dans lequel ils sont en suspension.

- 5 Une suspension de copolymère de l'exemple 1 dans le mélange tampon (tris/acétate/albumine) est préparée dans les mêmes conditions opératoires que celles utilisées dans l'étude spectroscopique telle présentée ci-dessus. Puis, 4 ml de suspension sont incubés dans le cylindre du rhéomètre (RS100 *Haake*) maintenu à 37°C. La mesure de la viscosité ( $\eta$ ) initiale est effectuée. Ensuite, 0,8 UE de chondroïtinases dissoutes  
10 dans 160 ml d'eau sont rajoutées à la suspension. Le témoin est une suspension de copolymère de l'exemple 1 préparée dans les conditions opératoires précédemment décrites, sans ajout d'enzyme et diluée dans 160 ml d'eau. L'évolution de la viscosité est suivie au cours du temps. L'essai est effectué deux fois pour chaque test.

- La figure 2 est une représentation semi-logarithmique de l'évolution de la viscosité de la  
15 suspension du copolymère de l'exemple 1 en présence d'enzymes (ligne continue) ou en absence d'enzymes (ligne témoin en pointillé). La viscosité du témoin qui est de l'ordre de  $17 \pm 3$  mPa.s, ne varie pas au cours du temps. Par contre, en présence d'enzymes, la viscosité chute progressivement de 17 mPa.s jusqu'à 3 mPa.s en 55 minutes puis devient quasi-stable. Cette chute importante de la viscosité s'explique par la dégradation  
20 du copolymère par les enzymes.

- De plus, suite aux études spectroscopique et rhéologique ci-dessus menées dans les mêmes conditions opératoires, on peut remarquer, au bout de 55 minutes d'incubation en présence d'enzymes, une chute quasi totale de la viscosité alors qu'il n'y a seulement qu'une partie des disaccharides provenant de la dégradation de la CS qui est détectée en  
25 solution. Ainsi, la dégradation de quelques sites du copolymère par les enzymes suffit pour avoir un effondrement du réseau tridimensionnel du copolymère.

Etude des comprimés à libération contrôlée

Les copolymères réticulés des exemples 1 à 6 sont tamisés puis mélangés avec de l'acide aminosalicylique (5ASA) et du stéarate de magnésium (rapport massique 79.5/20/0,5). Puis des comprimés de 250 mg et de dureté > 100 N sont préparés par compression directe.

Des essais de dissolution sont effectués sur les comprimés ainsi préparés, dans un appareillage à palette tournante (DISSOLUTEST) à 37°C sous une agitation de 50 tours/minutes. Les milieux de dissolution utilisés sont un mélange tampon de pH 1,2 et 7,5 correspondant respectivement aux milieux gastrique et intestinal artificiels (sans enzymes). Pour chaque formule et dans chaque milieu, l'essai est répété trois fois. A des temps déterminés, un échantillon du milieu de dissolution est prélevé et filtré. Le dosage du 5ASA est effectué par spectroscopie UV.

Le tableau 1 ci-dessous récapitule les temps (en heure) de libération de 50 % de la dose initiale du 5ASA ( $t_{50\%}$ ), obtenus en milieux gastrique et intestinal artificiels.

15

Tableau 1

Exemple	$t_{50\%}$ (milieu gastrique)	$t_{50\%}$ (milieu intestinal)
1	2,88	7,66
2	1,42	1,61
3	6,48	8,29
4	1,22	1,59
5	7,94	8,65
6	7,96	11,05

En milieu gastrique, les  $t_{50\%}$  varient entre 1,2 et 8 heures permettant ainsi de moduler la libération du principe actif et cela en fonction de la nature des copolymères. Parmi ces

copolymères, les copolymères des exemples 3, 5 et 6, ayant respectivement des  $t_{50\%}$  de 6,5 ; 7,9 et 8 h, modèrent de façon importante la libération du principe actif.

En milieu intestinal, les  $t_{50\%}$  varient entre 1,6 et 11 h permettant également de moduler la libération du principe actif et cela en fonction de la nature des copolymères. De plus, une  
5 modération importante de la libération du principe actif est obtenue avec les copolymères des exemples 1, 3, 5 et 6. En effet les  $t_{50\%}$  obtenus avec ces copolymères sont respectivement de 7,7 ; 8,3 ; 8,7 et 11 h.

Ainsi, les copolymères synthétisés permettent de réaliser des systèmes pharmaceutiques à libération contrôlée et cela en fonction des caractéristiques des copolymères réticulés.

10 Plus particulièrement, ceux qui possèdent la propriété de modérer de façon importante la libération du principe actif et d'être dégradables par les chondroïtinases, semblent être des candidats intéressants pour réaliser des systèmes à libération au niveau du colon par action de la flore microbienne.

### REVENDICATIONS

- 1- Copolymères réticulés à base de polymères polycarboxyliques non réticulés et d'un agent de réticulation comprenant au moins deux fonctions amine, les dits copolymères comprenant au moins un polysaccharide polycarboxylique et au moins un autre polymère polycarboxylique non réticulé qui n'est pas un polysaccharide polycarboxylique.
- 5 2- Copolymères selon la revendication 1, caractérisés en ce que le polysaccharide polycarboxylique est choisi parmi les glycosaminoglycanes, l'acide pectinique ou alginique.
- 3- Copolymères selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisés en ce que le polysaccharide polycarboxylique est un glycosaminoglycane choisi parmi l'acide  
10 hyaluronique, la chondroïtine sulfate, l'héparine, le sulfate de dermatane, le sulfate d'héparane, le sulfate de kératane.
- 4- Copolymères selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisés en ce que le polymère polycarboxylique non réticulé qui n'est pas un polysaccharide polycarboxylique est choisi parmi les polymères acryliques polycarboxyliques, le poly(acide glutamique), le  
15 poly(acide aspartique), le poly(acide maléique), le poly(acide malique) ou le poly(acide fumarique).
- 5- Copolymères selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisés en ce que le polymère polycarboxylique non réticulé qui n'est pas un polysaccharide polycarboxylique, est un polymère acrylique polycarboxylique.
- 20 6- Copolymères selon la revendication 5, caractérisés en ce que le polymère acrylique polycarboxylique est le poly(acide acrylique) ou le poly(acide méthacrylique).

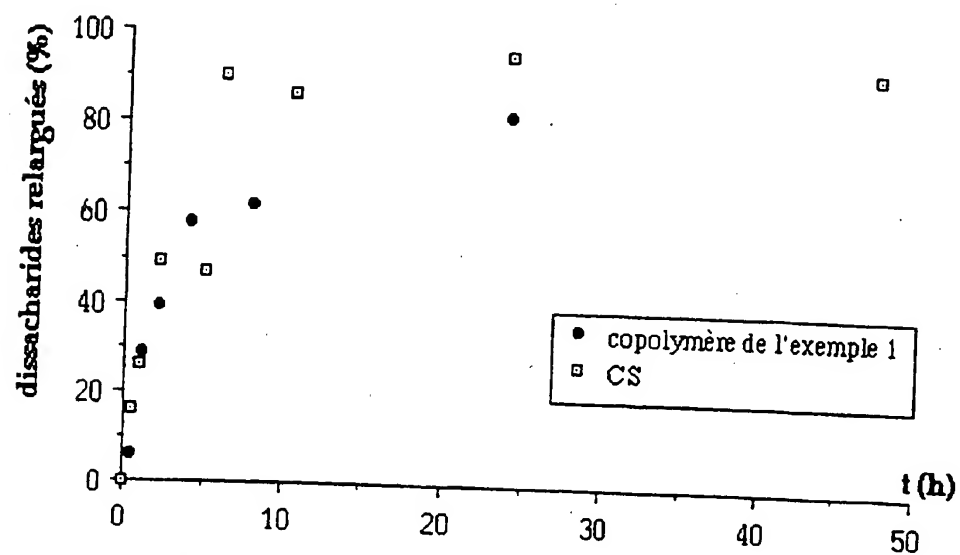


- 7- Copolymères selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lesquels l'agent de réticulation est choisi parmi les diamines, les acides aminés naturels ou synthétiques ou les polyamines.
- 8- Copolymères selon la revendication 7 dans lesquels l'acide aminé est choisi parmi la lysine, l'histidine ou l'ornithine.
- 9- Copolymères selon la revendication 7 dans lesquels la diamine est choisie parmi l'éthylènediamine, la butanediamine, l'hexanediamine, l'heptanediamine, l'octanediamine et la dodécanediamine.
- 10- Copolymères selon la revendication 7 dans lesquels la polyamine est choisie parmi le chitosane, la polyornithine ou la polylysine.
- 11- Copolymères selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisés en ce que le polysaccharide polycarboxylique est dégradable par la flore du colon.
- 12- Copolymères selon la revendication 11, caractérisés en ce que le polysaccharide polycarboxylique est choisi parmi la chondroïtine sulfate, l'acide hyaluronique, l'acide pectinique ou l'héparine.
- 13- Copolymères selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, 11 et 12, caractérisés en ce que le polysaccharide polycarboxylique est la chondroïtine sulfate, l'autre dit polymère polycarboxylique est le poly(acide acrylique) ou le poly(acide méthacrylique), et l'agent de réticulation est la lysine ou l'histidine.
- 14- Procédé de préparation de copolymères selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que l'on fait réagir, en milieu aqueux, les dits polymères polycarboxyliques non réticulés, en présence d'un activateur et dudit agent de réticulation.
- 15- Procédé selon la revendication 14, dans lequel l'activateur est choisi parmi les carbodiimides, les dérivés des quinolines et les anhydrides mixtes.

- 16- Composition pharmaceutique contenant au moins un principe actif et, à titre de support inerte ou d'excipient, au moins un copolymère selon l'une des revendications 1 à 10.
- 17 - Composition pharmaceutique contenant au moins un principe actif et, à titre de support inerte ou d'excipient, au moins un copolymère selon l'une des revendications 11 à 13.
- 18 - Utilisation d'une composition pharmaceutique selon l'une des revendications 16 à 17 pour une libération contrôlée.
- 19 - Utilisation d'une composition pharmaceutique selon l'une des revendications 16 à 17 en tant que système pharmaceutique bioadhésif.
- 20 - Utilisation d'une composition pharmaceutique selon la revendication 17 pour une libération spécifique du principe actif au niveau du colon.
- 21 - Utilisation selon la revendication 20 pour véhiculer le principe actif destiné au traitement des maladies du colon.
- 22 - Utilisation selon la revendication 20 pour véhiculer le principe actif qui est absorbé au niveau du colon.
- 23 - Utilisation selon la revendication 20 pour véhiculer le principe actif qui est dégradé dans les parties hautes du tube digestif.

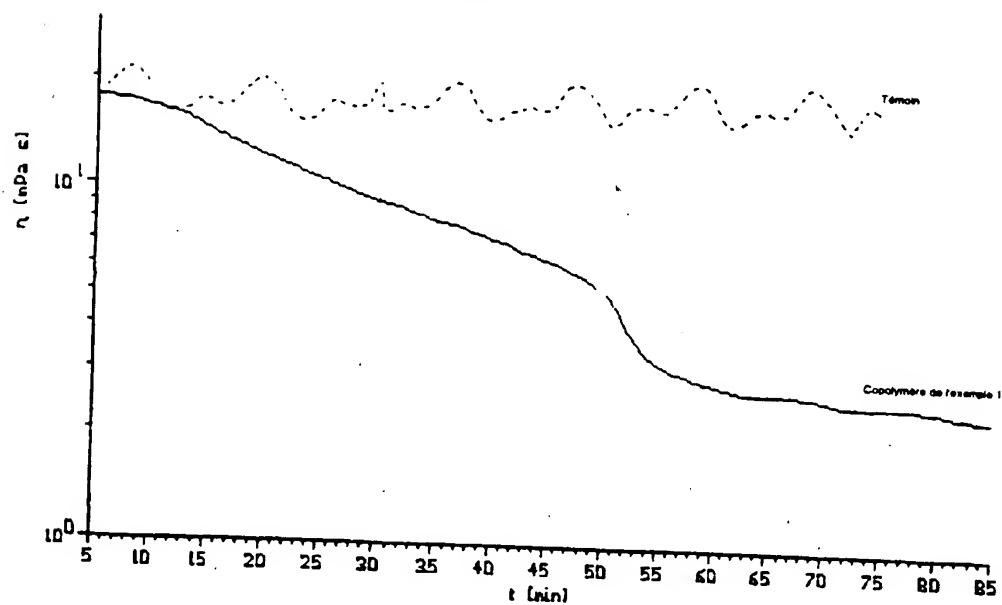
1 / 1

Fig. 1



5

Fig. 2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No

PCT/FR 97/01534

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 6 C08K5/17 C08B37/08 C08B37/06 C08B37/10 C08L5/08  
C08L33/06 A61K9/20 //(C08L5/08, 33:06), (C08L33/06, 5:08).

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C08K C08B A61K C08L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	WO 91 16881 A (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSAL) 14 November 1991 cited in the application see claims; example 5 ---	1-3, 7, 9, 11, 12, 14-17, 20, 23
A	US 4 026 851 A (GREENE) 31 May 1977 see abstract ---	1, 6, 7
A	WO 89 02445 A (GENZYME CORPORATION) 23 March 1989  see page 15; example 11 see claims see abstract ---	1, 2, 7, 8, 11, 12, 14, 15
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

**\* Special categories of cited documents :**

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 November 1997

Date of mailing of the international search report

09/12/1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mazet, J-F

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

FR 97/01534

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	<p>US 5 017 229 A (BURNS ET AL.) 21 May 1991</p> <p>see column 3, line 55 - column 4, line 68  see column 9, line 55 - line 57  see claims</p> <p>---</p>	<p>1-3, 7, 8,  10,  14-16, 18</p>
A	<p>EP 0 334 167 A (KNOLL AKTIENGESELLSCHAFT)  27 September 1989  see the whole document</p> <p>-----</p>	<p>1, 2, 4-6,  16, 18</p>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01534

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9116881 A	14-11-91	AU 660147 B AU 8087791 A DE 527942 T EP 0527942 A ES 2048133 T HU 210497 B HU 64210 A IL 98087 A US 5525634 A	15-06-95 27-11-91 03-03-94 24-02-93 16-03-94 28-04-95 28-12-93 14-11-96 11-06-96
US 4026851 A	31-05-77	JP 1270577 C JP 52023152 A JP 59046272 B	25-06-85 21-02-77 12-11-84
WO 8902445 A	23-03-89	US 4937270 A AT 138940 T AU 606230 B AU 2482588 A CA 1332235 A DE 3855351 D DE 3855351 T DK 68990 A EP 0397652 A FI 94357 B JP 9183804 A JP 3502704 T NO 942763 A US 5527893 A	26-06-90 15-06-96 31-01-91 17-04-89 04-10-94 11-07-96 10-10-96 17-05-90 22-11-90 15-05-95 15-07-97 20-06-91 16-03-90 18-06-96
US 5017229 A	21-05-91	AT 151294 T AU 660282 B AU 8392491 A DE 69125609 D DE 69125609 T EP 0537292 A ES 2100954 T WO 9200105 A US 5527893 A	15-04-97 22-06-95 23-01-92 15-05-97 17-07-97 21-04-93 01-07-97 09-01-92 18-06-96
EP 334167 A	27-09-89	DE 3809764 A	05-10-89

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01534

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
---	---------------------	----------------------------	---------------------

EP 334167 A

CA	1339194 A	05-08-97
DK	142789 A	24-09-89
ES	2054906 T	16-08-94
HU	9500712 A	28-12-95
JP	2006543 A	10-01-90
US	5230901 A	27-07-93

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche internationale No

/FR 97/01534

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C08K5/17 C08B37/08 C08B37/06 C08B37/10 C08L5/08  
C08L33/06 A61K9/20 //(C08L5/08, 33:06), (C08L33/06, 5:08)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C08K C08B A61K C08L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents no. des revendications visées

A WO 91 16881 A (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSAL) 14 novembre 1991  
citée dans la demande  
voir revendications; exemple 5  
1-3, 7, 9, 11, 12, 14-17, 20, 23

A US 4 026 851 A (GREENE) 31 mai 1977  
voir abrégé  
1, 6, 7

A WO 89 02445 A (GENZYME CORPORATION) 23 mars 1989  
voir page 15; exemple 11  
voir revendications  
voir abrégé  
1, 2, 7, 8, 11, 12, 14, 15

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

28 novembre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/12/1997

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mazet, J-F



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dep. le Internationale No

P. FR 97/01534

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 017 229 A (BURNS ET AL.) 21 mai 1991  voir colonne 3, ligne 55 - colonne 4, ligne 68 voir colonne 9, ligne 55 - ligne 57 voir revendications ---	1-3, 7, 8, 10, 14-16, 18
A	EP 0 334 167 A (KNOLL AKTIENGESELLSCHAFT) 27 septembre 1989 voir le document en entier -----	1, 2, 4-6, 16, 18

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Je internationale No

PCT/FR 97/01534

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membres(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9116881 A	14-11-91	AU 660147 B AU 8087791 A DE 527942 T EP 0527942 A ES 2048133 T HU 210497 B HU 64210 A IL 98087 A US 5525634 A	15-06-95 27-11-91 03-03-94 24-02-93 16-03-94 28-04-95 28-12-93 14-11-96 11-06-96
US 4026851 A	31-05-77	JP 1270577 C JP 52023152 A JP 59046272 B	25-06-85 21-02-77 12-11-84
WO 8902445 A	23-03-89	US 4937270 A AT 138940 T AU 606230 B AU 2482588 A CA 1332235 A DE 3855351 D DE 3855351 T DK 68990 A EP 0397652 A FI 94357 B JP 9183804 A JP 3502704 T NO 942763 A US 5527893 A	26-06-90 15-06-96 31-01-91 17-04-89 04-10-94 11-07-96 10-10-96 17-05-90 22-11-90 15-05-95 15-07-97 20-06-91 16-03-90 18-06-96
US 5017229 A	21-05-91	AT 151294 T AU 660282 B AU 8392491 A DE 69125609 D DE 69125609 T EP 0537292 A ES 2100954 T WO 9200105 A US 5527893 A	15-04-97 22-06-95 23-01-92 15-05-97 17-07-97 21-04-93 01-07-97 09-01-92 18-06-96
EP 334167 A	27-09-89	DE 3809764 A	05-10-89

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document internationale No

PCT/FR 97/01534

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 334167 A		CA 1339194 A	05-08-97
		DK 142789 A	24-09-89
		ES 2054906 T	16-08-94
		HU 9500712 A	28-12-95
		JP 2006543 A	10-01-90
		US 5230901 A	27-07-93

5<sup>th</sup> March 1998

English translation of the

wo 98/08897

1015 Rec'd PCT/PTD 26 MAR 1998

10/089287

### Description

The invention relates to cross-linked copolymers based on non cross-linked polycarboxylic polymers, said copolymers containing at least a polycarboxylic polysaccharide. The invention also relates to a process for the preparation of these  
5 copolymers and their use in particular as a support for pharmaceutical compositions.

Certain compounds with a polymeric structure containing a polycarboxylic polysaccharide, optionally modified, have been described in the literature. For example, Patent Application WO 89/02445 describes a gel based on hyaluronic acid: but, in its structure, this gel only comprises hyaluronic acid and no other polycarboxylic polymer.  
10 Moreover, no cross-linking agent is used in the preparation of this gel. The compound obtained in this way is mainly used in surgery. Patent Application WO91/16881 describes, among others, the combination of an active ingredient with a matrix constituted by a modified polymer, i. e. to which saccharides are grafted. This modified polymer can be a natural polymer such as chondroitin sulphate. However, this matrix  
15 contains only one type of polymer.

The copolymers according to the invention based on polycarboxylic polymers, contain at least one polycarboxylic polysaccharide and at least one other polycarboxylic polymer which is not a polysaccharide. The combination of a polysaccharide with another type of polycarboxylic polymer, allows the modulation of the properties of the  
20 polysaccharides such as the hydrophilicity. In this way copolymers can be obtained with appropriate degradation properties according to their uses. Moreover, the copolymers according to the invention are advantageously prepared in an aqueous medium. This is a real advantage as it is almost impossible to totally eliminate the solvents in a polymer structure; the existence of traces of residual aqueous solvents is  
25 generally more easily acceptable and accepted than traces of residual organic solvents such as dimethylsulphoxide or dimethylformamide.

A subject of the invention is cross-linked copolymers based on non cross-linked polycarboxylic polymers and a cross-linking agent comprising at least two amine functions, said copolymers comprising at least one polycarboxylic polysaccharide and at least one other non cross-linked polycarboxylic polymer which is not a  
5 polycarboxylic polysaccharide.

The non cross-linked polycarboxylic polysaccharide can be chosen, for example, from glycosaminoglycans, pectinic acid, alginic acid, carboxylic derivatives of dextran such as the carboxymethyldextrans, or the carboxylic derivatives of cellulose such as carboxymethylcelluloses. Among the glycosaminoglycans, there can be mentioned  
10 hyaluronic acid, chondroitin sulphate, heparin, dermatan sulphate, heparan sulphate, keratan sulphate or a mixture of the latter. Among the polycarboxylic polymers which are not polysaccharides, there can be mentioned poly(glutamic acid), poly(aspartic acid), poly(maleic acid), poly(malic acid) or poly(fumaric acid), the polycarboxylic acrylic polymers such as poly(acrylic acid), poly(methacrylic acid) or the copolymers of  
15 the latter such as Eudragits® L and S. The expression polycarboxylic polymers includes the polymers as defined above but also the partly or totally substituted derivatives of these polymers such as, for example, their esters, their amides or their salts, copolymers containing the units present in these polycarboxylic polymers or in their derivatives as defined above, but also a mixture of these polymers and/or of their derivatives and/or of  
20 their copolymers as defined above.

Claim 1  
A more particular subject of the invention is cross-linked copolymers as defined above, characterized in that the polysaccharide is chosen from pectinic or alginic acid, glycosaminoglycans, and preferably hyaluronic acid, chondroitin sulphate, heparin, dermatan sulphate, heparan sulphate, keratan sulphate or a mixture of the latter.

25 A more particular subject of the invention is cross-linked copolymers as defined above, characterized in that the non cross-linked polycarboxylic polymer which is not a

polycarboxylic polysaccharide, is chosen from polycarboxylic acrylic polymers, poly(glutamic acid), poly(aspartic acid), poly(maleic acid), poly(malic acid) or poly(fumaric acid). The non cross-linked polycarboxylic polymer, which is preferably not a polycarboxylic polysaccharide, is a polycarboxylic acrylic polymer and more particularly poly(acrylic acid) or poly(methacrylic acid).

The polycarboxylic polymers according to the invention are linked together by a cross-linking agent. This cross-linking agent comprises at least two amine functions which are capable of reacting with the free carboxylic functions of said non cross-linked carboxylic polymers. It can be chosen, for example, from proteins, polyamines, triamines, diamines, natural or synthetic amino acids, or the derivatives of compounds as defined above such as, for example, their salts, esters or amides. Among the amino acids there can be mentioned, for example, arginine, lysine, histidine and ornithine. Among the diamines there can be mentioned, ethylenediamine, butanediamine, hexanediamine, heptanediamine, octanediamine or dodecanediamine. Among polyamines there can be mentioned, chitosan, poly(amino acid) such as polylysine or polyornithine, as well as the copolymers of these polyamines. The cross-linking agent can also be chosen from compounds such as spermine, spermidine, melamine, guanidine or diethylenetriamine. The cross-linking agent used is preferably an amino acid and advantageously lysine, ornithine or histidine.

A more particular subject of the invention is also cross-linked copolymers as defined above, characterized in that the polycarboxylic polysaccharide is a polycarboxylic polysaccharide which can be degraded by the microbial flora of the colon such as chondroitin sulphate, hyaluronic acid, pectinic acid or heparin.

A more particular subject of the invention is cross-linked copolymers as defined above, characterized in that the polycarboxylic polysaccharide is chondroitin sulphate and the

other said polycarboxylic polymer is chosen from poly(acrylic acid) and poly(methacrylic acid), and the cross-linking agent is lysine or histidine.

A subject of the invention is also a process for the preparation of cross-linked copolymers as defined above, said process characterized in that said non cross-linked  
5 polycarboxylic polymers constituting the cross-linked copolymer are reacted in the presence of an activator and a cross-linking agent comprising at least two amine functions, in an appropriate reaction medium. The preparation of the cross-linked copolymers as defined above is preferably carried out in an aqueous medium. The expression aqueous medium means a medium only containing water or water mixed  
10 with one or more solvents which are miscible with water such as, for example, acetone or lower alcohols such as ethanol. The aqueous medium preferably only comprises water. The implementation of the process according to the invention can be carried out in various manners. In fact, the process may consist in mixing non cross-linked polycarboxylic polymers and the cross-linking agent, then adding the activator. The  
15 cross-linking process according to the invention can also consist in mixing together non cross-linked polycarboxylic polymers and the activator, then adding the cross-linking agent. The process may also consist in cross-linking one of the non cross-linked polycarboxylic polymers constituting the copolymer, mixing said polymer with the cross-linking agent then the activator, or the activator then the cross-linking agent, then  
20 adding at least one other non cross-linked polycarboxylic polymer to the reaction medium, in order to cross-link it with said polymer present in the reaction mixture. During the implementation of the process, the reagents introduced can previously be solubilized in the chosen reaction medium. The non cross-linked polycarboxylic polymers and the cross-linking agent are preferably mixed together in an aqueous  
25 medium until solubilization, then the activator is added. The process is implemented at a temperature comprised between -30° to 100° C, preferably between 0 and 40° C, and more preferably at ambient temperature. The implementation process for the cross-

linking process is of course lower than the degradation or decomposition temperatures of the reagents introduced.

The relative proportions of the reagents constituted by the non cross-linked polycarboxylic polymers, the cross-linking agent and the activator, can vary according to the characteristics of the sought copolymers. The proportions of the non cross-linked polycarboxylic polymers are defined with respect to the molar quantities of the carboxylic functions present per base unit. The non cross-linked polycarboxylic polymers can vary within a molar ratio comprised between 0.01 and 100. The molar ratio of the cross-linking agent with respect to the total carboxylic functions can vary between 0.01 and 100. The molar ratio of the activator with respect to the total carboxylic functions can vary from 0.01 and 100.

The activator can be chosen from coupling agents in standard use in peptide synthesis. The activator can thus be chosen, for example, from carbodiimides, quinoline derivatives or mixed anhydrides. As examples of carbodiimides, there can be mentioned hydrohalogenides such as N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethyl carbodiimide hydrochloride (EDC), N-cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl) carbodiimide (CMC). As examples of quinoline derivatives, there can be mentioned 2-ethoxy-N-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline (EEDQ), N-isobutoxycarbonyl-2-isobutoxy-1,2-dihydroquinoline (IIDQ), N-isobutoxycarbonyl-2-methoxy-1,2-dihydroquinoline (IMDQ), N-isobutoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (IEDQ). As examples of mixed anhydrides there can be mentioned chloroformates and more particularly isobutylchloroformate (IBC). The activator used is preferably N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethyl carbodiimide hydrochloride.

The cross-linked copolymers according to the invention can be used, for example, in the pharmaceutical, cosmetic, biomedical, veterinary, chemical, agro-chemical or agro-alimentary fields.



A more particular subject of the invention is a pharmaceutical composition containing at least one active ingredient and, as an inert support or an excipient, at least one cross-linked copolymer according to the invention. The expression active ingredient means any substance or a mixture of substances having a therapeutic activity.

5 Such a composition can be produced from these different components by any standard technique known to a person skilled in the art. They can be presented, for example, in the form of matrix tablets, tablets coated with the copolymers of the present invention, multi-layered tablets, matrix pellets, pellets or microparticles coated with the copolymers of the invention. These microparticles and pellets may or may not be  
10 contained in capsules. It can also be presented in the form of microparticles or nanoparticles at least one constituent of which is a copolymer of the present invention or else in any form allowing oral administration. It can also be presented in any form suited for the chosen or appropriate administration method such as suppositories, or preparations for local application or injection. The quantity of active ingredient  
15 allowing effective pharmacological action, and in particular therapeutic action, can vary according to the type of active ingredient, the age and/or to the illness of the patient to be treated.

A subject of the present invention is also the use of a pharmaceutical composition according to the invention for a sustained release of the active ingredient(s) it contains.

20 Such compositions can also possess other characteristics which optionally depend on the characteristics of the initial polycarboxylic polymers such as bioadhesion. Thus, a pharmaceutical composition according to the invention can also be used as a bioadhesive pharmaceutical system. A subject of the present invention is therefore also the use of a pharmaceutical composition according to the invention as a bioadhesive  
25 system.

Compositions as defined above in which the polycarboxylic polysaccharide can be degraded by the flora of the colon can also be used as a specific release system at the level of the colon by the action of microbial flora. The concept of specific release at the level of the colon by the action of microbial flora is based on the property of the colon to possess a very abundant microbial flora which, moreover, has the potential to metabolize substances which are slightly degraded or not degraded by the upper part of the digestive tube. Such compositions are particularly suitable for conveying active ingredients intended for the treatment of diseases of the colon, which allows their effectiveness to be increased and their side effects to be reduced. These active ingredients include steroids such as dexamethasone or hydrocortisone, non-steroidal anti-inflammatories such as 5-aminosalicylic acid, antineoplastics such as methotrexate or tamoxifen, antispasmodics and chemotherapy agents. Such compositions are also particularly suited for conveying active ingredients which are absorbed more efficiently at the level of the colon such as steroids or xanthine. Their direct administration at the level of the colon allows their effectiveness to be increased. Such compositions are also particularly suited to conveying active ingredients which are degraded in the upper parts of the digestive tube. Among these active ingredients, there can be mentioned peptides and proteins such as oral vaccines, insulin, contraceptive peptides, plasminogen activator peptides, growth peptides, LH/RH.

These following examples are presented in order to illustrate the above processes and should in no event be considered as restriction to the scope of the invention

## EXPERIMENTAL PART

### Example 1

1.33 of the sodium salt of chondroitin sulphate (A at 70 %, C at 30 %) (CS), 0.29 of the sodium salt of polymethacrylic acid (PMA) and 3.35 g of L-lysine monohydrochloride are mixed together in 9 ml of bidistilled water until a limpid solution is obtained which

is subsequently degassed. Then 4.59 g of N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) is added. The pH is maintained between 6 and 7 by successively adding of 2.5 N hydrochloric acid. The reaction is carried out at ambient temperature for 6 hours. Then, the reaction medium is transferred to a dialysis apparatus  
5 (Spectra/por, cutoff threshold 12-14 KD) and dialyzed four times against 4 litres of water each time. The precipitate obtained in this way is washed with water then dried. The sought chondroitin sulphate and polymethacrylic acid copolymer is obtained with an average mass =  $1.53 \pm 0.12$  g. The use of sulphur as a marker for chondroitin sulphate allows the definition by elementary analysis of the percentage by mass of  
10 chondroitin sulphate in the copolymer which is equal to  $59 \pm 2$  %.

#### Example 2

The operation is carried out in the same manner as in Example 1, but using 1.77 g of L-lysine monohydrochloride and 2.76 g of EDC. The mass of the copolymer obtained is  $1.06 \pm 0.15$  g; the percentage by mass of CS in the precipitate is  $55 \pm 2$ .

#### 15 Example 3

The operation is carried out in the same manner as in Example 1, but using 7.06 g of L-lysine monohydrochloride and 8.21 g of EDC. The mass of the copolymer obtained is  $1.61 \pm 0.12$  g ; the percentage by mass of CS in the precipitate is  $61 \pm 1$ .

#### Example 4

20 The operation is carried out in the same manner as in Example 1, but using 3 g of histidine instead of L-lysine. The mass of the copolymer obtained is  $1.94 \pm 0.01$  g ; the percentage by mass of CS in the precipitate is  $48 \pm 3$ .

#### Example 5

The operation is carried out in the same manner as in Example 1, but using 0.43 g of PMA, 4.5 g of L-lysine monohydrochloride and 5.82 g of EDC. The mass of the copolymer obtained is  $1.86 \pm 0.05$  g ; the percentage by mass of CS in the precipitate is

5  $58 \pm 2$ .

#### Example 6

The operation is carried out in the same manner as in Example 1, but using 0.58 g of PMA, 5.45 g of L-lysine monohydrochloride and 7.05 g of EDC. The mass of the copolymer obtained is  $2.07 \pm 0.01$  g ; the percentage by mass of CS in the precipitate is

10  $54 \pm 2$ .

#### Example 7

Tests on the solubilization of the copolymer of Example 1 are carried out in the following solvents and mixture of solvents: water of pH 3 and 7, acetonitrile, ethanol, tetrahydrofuran, dichloromethane, dimethylsulphoxide, dimethylacetamide, acetone,

15 dioxane, triethylamine, chloroform, petroleum ether, hexane, dimethylformamide, benzyl alcohol, heptane, isopropyl alcohol, 1,2-propanediol, water/acetone mixture (50 % / 50 %), water/ethanol mixture (50 % / 50 %).

The copolymer is insoluble in all these solvents which demonstrates its cross-linked character.

### 20 Study of the enzymatic degradation of copolymers

#### 1- spectroscopic study

We are here studying the degradation of the copolymers of the invention based on chondroitin sulphate by chondroitinases, enzymes of the microbial flora of the colon.

Suspensions of the copolymers of Examples 1 to 6, in a buffer (acetate/tris/albumin) at pH 7.3, are prepared and stirred for a few hours in order to stabilize them. The suspensions contain 67 mg of CS/ml of buffer. A solution of chondroitinases is added at a rate of  $3.10^{-3}$  EU (Enzymatic Unit) for each mg of CS contained in the suspension.

- 5 The mixture is incubated at 37°C. At determined times, a suspension is centrifuged at 4°C then filtered. Then a study of UV absorbance of the supernatant is carried out. The disaccharides originating from the degradation of the CS have a maximum absorption at 230-240 nm (Yamagata, T. et al., *J. Biol. Chem.*, 243(7) : 1523-1535 (1968); Salyers, A. et al., *J. Bacteriol.*, 143(2) : 772-780). The control is a solution of non cross-linked
- 10 CS prepared under the same operating conditions as above.

The kinetics of the appearance in solution of the disaccharides originating from the degradation of non cross-linked CS and from the copolymer obtained in Example 1 are presented in Figure 1 below.

- These results show that the copolymer of Example 1 is degraded by the enzymes.
- 15 Comparison of the degradation of the copolymer of Example 1 with that of the control, shows that the copolymer, although cross-linked, is rapidly degraded by the enzymes.

The same tests are carried out on the copolymers of Examples 2 to 6; the results show that these copolymers containing the CS are degraded by the chondroitinases.

## 2- Rheological study

- 20 The enzymatic degradation of the copolymers leads to the appearance of molecular chains of smaller sizes and should therefore lead to a reduction in the viscosity of the medium in which they are suspended.

- A suspension of the copolymer of Example 1 in the buffer mixture (tris/acetate/albumin) is prepared under the same operating conditions as those used in
- 25 the spectroscopic study as presented above. Then 4 ml of suspension is incubated in the

cylinder of the rheometer (*Haake* RS 100) maintained at 37°C. Measurement of the initial viscosity ( $\eta$ ) is carried out. Then 0.8 EU of chondroitinases dissolved in 160 ml of water are added to the suspension. The control is a suspension of the copolymer of Example 1 prepared under the operating conditions previously described, without  
5 addition any enzyme and diluted in 160 ml of water. The evolution of the viscosity is monitored over time. The experiment is carried out twice for each test.

Figure 2 is a semi-logarithmic illustration of the evolution of the viscosity of the suspension of the copolymer of Example 1 in the presence of enzymes (continuous line) or in the absence of enzyme (dotted control line). The viscosity of the control, which is  
10 of the order of  $17 \pm 3$  mPa.s, does not vary over time. On the other hand, in the presence of enzymes, the viscosity progressively drops from 17 mPa.s to 3 mPa.s over 55 minutes then becomes quasi-stable. This significant drop in viscosity is explained by the degradation of the copolymer by the enzymes.

Moreover, following the above spectroscopic and rheological studies carried out under  
15 the same operating conditions, there can be observed, after incubation in the presence of enzymes for 55 minutes, a virtually total drop in viscosity although only part of the disaccharides originating from the degradation of the CS which is detected in solution. The degradation of a few sites of the copolymer by the enzymes is sufficient to entail a collapse of the three-dimensional network of the copolymer.

#### 20 **Study of sustained release tablets**

The cross-linked copolymers of Examples 1-6 are sieved then mixed with aminosalicyclic acid (5ASA) and magnesium stearate (mass ratio 79.5/20/0.5). Then the 250 mg tablets having a hardness  $>100$  N are prepared by direct compression.

Dissolution tests are carried out on the tablets prepared in this way, in a device with a  
25 rotating vane (DISSOLUTEST) at 37°C under stirring at 50 revolutions/minute. The

dissolution medium used is a buffer mixture of pH 1.2 and 7.5 respectively corresponding to the artificial gastric and intestinal medium (without enzymes). For each formula and in each medium, the test is carried out three times. At determined times, a sample of the dissolution medium is taken and filtered. Dosage of the 5ASA is carried out by UV spectroscopy.

Table 1 below summarizes the time (in hours) taken to release 50 % of the initial dose of 5ASA ( $t_{50\%}$ ) obtained in artificial gastric and intestinal media.

**Table 1**

Example	$t_{50\%}$ (gastric medium)	$t_{50\%}$ (intestinal medium)
1	2.88	7.66
2	1.42	1.66
3	6.48	8.29
4	1.22	1.59
5	7.94	8.65
6	7.96	11.05

In gastric medium, the  $t_{50\%}$ 's vary from 1.2 et 8 hours thus allowing the release of the active ingredient to be modulated according to the type of copolymer. Among these copolymers, the copolymers of Examples 3, 5 and 6 respectively having a  $t_{50\%}$ 's of 6.5, 7.9 and 8 hours, significantly moderate the release of active ingredient.

In an intestinal medium, the  $t_{50\%}$ 's vary from 1.6 and 11 hours, also allowing modulation of the release of the active ingredient according to the type of copolymers. Moreover, a significant moderation of the release of the active ingredient is obtained with the

copolymers of Examples 1, 3, 5 and 6. In fact, the  $t_{50\%}$ 's obtained with these copolymers are 7.7, 8.3, 8.7 and 11 hours respectively.

The synthesized copolymers therefore allow the creation of sustained release pharmaceutical systems according to the characteristics of the cross-linked copolymers.

- 5 More particularly, those which possess the property of significantly modulating the release of the active ingredient and being degradable by chondroitinases appear to be useful candidates for creating sustained release systems at the level of the colon by the action of the microbial flora.



## Claims

- 1- Cross-linked copolymers based on non cross-linked polycarboxylic polymers and a cross-linking agent comprising at least two amine functions, said copolymers comprising at least one polycarboxylic polysaccharide and at least one other non cross-linked polycarboxylic polymer which is not a polycarboxylic polysaccharide.
- 5 2- Copolymers according to claim 1, characterized in that the polycarboxylic polysaccharide is chosen from glycosaminoglycans, pectinic or alginic acid.
- 3- Copolymers according to one of the claims 1 or 2, characterized in that the polycarboxylic polysaccharide is a glycosaminoglycan chosen from hyaluronic acid, chondroitin sulphate, heparin, dermatan sulphate, heparan sulphate and keratan  
10 sulphate.
- 4- Copolymers according to one of the claims 1 to 3, characterized in that the non cross-linked polycarboxylic polymer which is not a polycarboxylic polysaccharide, is chosen from polycarboxylic acrylic polymers, poly(glutamic acid), poly(aspartic acid), poly(maleic acid), poly(malic acid) or poly(fumaric acid).
- 15 5- Copolymers according to any one of claims 1 to 4, characterized in that the non cross-linked polycarboxylic polymer which is not a polycarboxylic polysaccharide is a polycarboxylic acrylic polymer.
- 6- Copolymers according to claim 5, characterized in that the polycarboxylic acrylic polymer is poly(acrylic acid) or poly(methacrylic acid).
- 20 7- Copolymers according to any one of claims 1 to 6, in which the cross-linking agent is chosen from diamines, natural or synthetic amino acids or polyamines.

- 8- Copolymers according to claim 7, in which the amino acid is chosen from lysine, ornithine or histidine.
- 9- Copolymers according to claim 7, in which the diamine is chosen from ethylenediamine, butanediamine, hexanediamine, heptanediamine, octanediamine and  
5 dodecanediamine.
- 10- Copolymers according to claim 7, in which the polyamine is chosen from chitosan, polyornithine or polylysine.
- 11- Copolymers according to one of claims 1 to 10, characterized in that the polycarboxylic polysaccharide can be degraded by the flora of the colon.
- 10 12- Copolymers according to claim 11, characterized in that the polycarboxylic polysaccharide is chosen from chondroitin-sulphate, hyaluronic acid, pectinic acid or heparin.
- 13- Copolymers according to any one of claims 1 to 8 and 11 to 12, characterized in that the polycarboxylic polysaccharide is chondroitin-sulphate, the other said  
15 polycarboxylic polymer is poly(acrylic acid) or poly(methacrylic acid), and the cross-linking agent is lysine or histidine.
- 14- Process for the preparation of copolymers according to any one of claims 1 to 13, characterized in that said non cross-linked polycarboxylic polymers are reacted in an aqueous medium, in the presence of an activator and of said cross-linking agent.
- 20 15- Process according to claim 14, in which the activator is chosen from carbodiimides, quinoline derivatives and mixed anhydrides.
- 16- Pharmaceutical composition containing at least one active ingredient and, as an inert support or excipient, at least one copolymer according to one of claims 1 to 10.

17- Pharmaceutical composition containing at least one active ingredient and, as an inert support or excipient, at least one copolymer according to one of claims 11 to 13.

18- Use of a pharmaceutical composition according to one of claims 16 to 17 for sustained release.

5 19- Use of a pharmaceutical composition according to one of claims 16 to 17 as a bioadhesive pharmaceutical system.

20- Use of a pharmaceutical composition according to claim 17, for a specific release of the active ingredient at the level of the colon.

10 21- Use according to claim 20, to convey the active ingredient intended for the treatment of diseases of the colon.

22- Use according to claim 20, to convey the active ingredient which is absorbed at the level of the colon.

15 23- Use according to claim 20, to convey the active ingredient which is degraded in the upper parts of the digestive tube.